

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 949**

51 Int. Cl.:

C12C 3/08 (2006.01)

C12C 3/12 (2006.01)

C12H 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2017 PCT/EP2017/052450**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.08.2017 WO17134263**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2017 E 17705043 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3411468**

54 Título: **Extracto de lúpulo estable a la luz**

30 Prioridad:

05.02.2016 EP 16154513

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.11.2023

73 Titular/es:

**HEINEKEN SUPPLY CHAIN B.V. (100.0%)
Burgemeester Smeetsweg 1
2382 PH Zoeterwoude, NL**

72 Inventor/es:

**BROUWER, ERIC RICHARD;
DEKONINCK, TINNE;
VANBENEDEN, NELE;
VAN VEEN, MARCEL y
SCHOUTEN, MARIA ELIZABETH WILHELMINA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 952 949 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extracto de lúpulo estable a la luz

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a extractos de lúpulo estables a la luz y a la aplicación de dichos extractos de lúpulo en la cerveza. La invención proporciona además un método para preparar tal extracto de lúpulo estable a la luz, donde dicho método comprende iluminar un extracto de lúpulo preisomerizado.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Los lúpulos son las flores femeninas de la planta del lúpulo *Humulus lupulus*. Se utilizan como ingrediente en la cerveza, a la que aportan un sabor amargo y ácido. Por lo general, el lúpulo se seca en un secadero antes de usarse en el proceso de elaboración de la cerveza. En el proceso de elaboración, el mosto (líquido rico en azúcar producido a partir de la malta) se hierve con lúpulos antes de enfriarlo y añadirle levadura para iniciar la fermentación.

[0003] Hervir el mosto con lúpulos da como resultado la extracción de ácidos alfa (humulonas, como humulona, adhumulona, cohumulona, posthumulona y prehumulona) en el mosto dulce, que, bajo la influencia de la temperatura (isomerización térmica), se isomerizan parcialmente hasta convertirse en los ácidos alfa correspondientes (isohumulonas). Estos iso-alfa-ácidos son los responsables del característico sabor amargo de la cerveza lupulada. Los niveles típicos de ácido alfa en el mosto al comienzo de la ebullición del mosto están por debajo del 0,01 % en peso (por debajo de 100 ppm). Las desventajas de este enfoque de lupulación tradicional para aportar amargor son la extracción e isomerización ineficientes de ácidos alfa, lo que generalmente da como resultado rendimientos de iso-alfa-ácidos por debajo del 40 %.

[0004] La utilización del lúpulo se puede mejorar significativamente llevando a cabo la isomerización del ácido alfa fuera del proceso de elaboración de la cerveza. Para ello se han desarrollado productos de lúpulo preisomerizados. Estos productos de lúpulo preisomerizados se elaboran a partir de extracto de lúpulo.

[0005] Los extractos de lúpulo generalmente se obtienen mediante extracción con dióxido de carbono líquido o supercrítico. Los extractos de lúpulo con dióxido de carbono proporcionan predominantemente ácidos alfa (humulonas) junto a ácidos beta (lupulonas), y pueden fraccionarse aún más para obtener extractos de lúpulo enriquecidos con ácidos alfa. A partir de estos extractos que contienen ácidos alfa, la isomerización previa "fuera de línea" de los ácidos alfa fuera del proceso de elaboración de la cerveza (ebullición del mosto) se puede lograr utilizando compuestos basados en metales alcalinos y/o metales alcalinotérreos a través de dos enfoques. En el primer enfoque se aplica un medio de reacción sin disolventes, mientras que en el otro enfoque la transformación se realiza después de la adición de disolventes, ya sea agua pura o, alternativamente, agua mezclada con un disolvente orgánico.

[0006] Se conoce la isomerización del ácido alfa en iso-alfa-ácidos por medio de fotólisis. En el documento AU 7540281, por ejemplo, se describe un proceso para la valorización de las sustancias amargas del lúpulo, y más concretamente de ácidos alfa y beta prácticamente puros obtenidos a partir de un extracto de lúpulo altamente purificado, en particular mediante tratamiento con dióxido de carbono líquido, caracterizado por el hecho de que los ácidos alfa y/o beta se someten a fotólisis por la luz solar, durante un tiempo predeterminado, en condiciones adaptadas para producir un rendimiento cuántico óptimo en condiciones de temperatura adecuadas, preferiblemente cercanas a los 60 °C, para obtener respectivamente iso-alfa-ácidos y desoxi-alfa-ácidos.

[0007] En el documento US 4,767,640 se describe un método para preparar un producto de lúpulo estable a la luz que consiste esencialmente en isohumulonas reducidas y menos del 0,5 % de isohumulonas no reducidas y productos inestables que no son isohumulonas. En el ejemplo 1 se describe un proceso en el que se redujo un extracto de lúpulo isomerizado, seguido de acidificación y separación de la capa acuosa y la capa oleosa. El extracto oleoso así obtenido contenía un 70 % de isohumulona reducida, un 6,5 % de material de fondo y menos de un 0,5 % de isohumulona sin reducir. En el Ejemplo 3 se describe cómo se purificó adicionalmente el extracto oleoso para producir una "Fase acuosa pospurificada" y una "Fase oleosa pospurificada". En el ejemplo 4 se describe la separación cromatográfica del extracto oleoso del ejemplo 1 en tres fracciones. En el ejemplo 5 se describe un experimento en el que se evaluó la estabilidad a la luz de los extractos purificados anteriormente mencionados ("Fase acuosa postpurificada" y "Fase oleosa postpurificada") y de las tres fracciones cromatográficas. Esto se hizo añadiendo estos materiales a la cerveza e irradiándola durante 2 horas con 600 fc de luz fluorescente.

[0008] En el documento WO 93/02177 se describe un proceso para producir un agente estabilizador de espuma y amargante para una bebida de malta caracterizado por extraer lúpulos en condiciones que favorecen la separación y recuperación de una fracción rica en adprehumulona, y someter la fracción de adprehumulona a fotoisomerización para producir iso-adprehumulona.

[0009] En el documento US 5,811,144 se describe un proceso para la producción de una cerveza en el que se lupula un mosto que tiene un alto contenido de riboflavina para producir la bebida deseada, donde la mejora comprende tratar el mosto con una cantidad eficaz de radiación actínica adaptada para descomponer la riboflavina y que tiene una longitud de onda de 300 a 700 nanómetros; donde, durante dicho tratamiento con la radiación actínica, el mosto se mantiene a una temperatura de aproximadamente 25 °C-90 °C y es sustancialmente anaeróbico; por lo que el contenido de riboflavina se reduce a menos de 0,2 ppm y la cerveza resultante tiene una mayor estabilidad a la luz.

[0010] El documento WO 2006/104387 se refiere a una composición que se puede usar como aditivo en bebidas o alimentos para prevenir o reducir los cambios de sabor inducidos por la luz. La composición contiene al menos 10 µg de pirroles sustituidos por kg de materia seca y al menos 100 mg por kg de materia seca de una piranona seleccionada del grupo que consiste en maltol, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona y combinaciones de estos.

[0011] El documento WO 2011/054838 se refiere a una botella, recipiente o vaso para bebidas para contener una bebida a base de lúpulo, que incluye una concentración de entre 10 µg/l y 10 mg/l de riboflavina, donde dicha botella, recipiente o vaso para bebidas es al menos parcialmente transparente o translúcido a la luz visible y tiene una característica de filtro óptico que evita la transmisión de luz de longitudes de onda entre 200 nm y 510 nm a un nivel que evita la generación de una concentración de MBT superior a la que se puede percibir con el gusto en dicha bebida a través de reacciones fotoquímicas y reacciones autocatalíticas iniciadas fotoquímicamente en las que está implicada dicha riboflavina.

[0012] El documento GB 2,362,891 se refiere a un método para proporcionar una bebida que comprende tratar una bebida malteada tal como cerveza para modificar el sabor o aroma original de la bebida tal como se ha preparado mediante la exposición de la bebida a una fuente de luz cuando la bebida se dispensa para su consumo.

[0013] Es bien sabido que la calidad del sabor de la cerveza se ve comprometida por la exposición a la luz, un fenómeno que generalmente se denomina sabor a 'golpe de luz' o 'golpe de sol', y que se desencadena por la degradación inducida por la luz de los iso-alfa-ácidos.

[0014] El mecanismo formal para la formación del sabor a golpe de luz de la cerveza en sistemas modelo, compuestos de isohumulonas, riboflavina y cisteína, al exponerse a la luz visible, fue sugerido por Kuroiwa et al. ya en 1963. La riboflavina fotoexcitada induce la escisión de las isohumulonas en un radical 4-metilpent-3-enoilo, que sufre descarbonilación en un radical 3-metilbut-2-enilo. La captura de este radical alilo estabilizado por un radical tiol derivado de la cisteína conduce a la formación de 3-metilbut-2-en-1-tiol (3-MBT), la sustancia responsable del sabor a golpe de luz. El 3-MBT tiene un nivel de umbral de sabor extremadamente bajo de alrededor o menos de 1 ppt.

[0015] Para que se produzca la formación de 3-MBT en la cerveza, además de los iso-alfa-ácidos, la reacción requiere energía luminosa en el rango de 300-550 nm del espectro, un fotosensibilizador (por ejemplo, riboflavina, es decir, vitamina B2) y una fuente de azufre (por ejemplo, aminoácido que contiene azufre).

[0016] La degradación fotolítica de los iso-alfa-ácidos se produce como consecuencia de la presencia de una cadena lateral de iso-3-hexenoilo en las moléculas de iso-alfa-ácido. Al modificar la estructura molecular de los iso-alfa-ácidos, en particular reduciendo los enlaces C=C y/o C=O en la cadena lateral de iso-3-hexenoilo, se puede evitar la formación sustancial de 3-MBT en la cerveza.

[0017] Los derivados de iso-alfa-ácido reducido que están disponibles comercialmente contienen dihidro-, tetrahidro- y/o hexahidro-iso- alfa-ácidos, y generalmente se añaden después del paso de fermentación primaria del proceso de elaboración de la cerveza. Los dihidro-iso-alfa-ácidos (también llamados rho-iso-alfa-ácidos) se obtienen por la reducción del grupo carbonilo en la cadena iso-3-hexenoilo antes mencionada en un grupo hidroxilo, generalmente utilizando borohidruro de metal alcalino como agente reductor. Los tetrahidro-iso-alfa-ácidos se obtienen por hidrogenación de los enlaces C=C en la cadena lateral de iso-3-hexenoilo y la cadena lateral de isopentenilo antes mencionadas. Los hexahidro-iso-alfa-ácidos se producen combinando los procesos de reducción e hidrogenación antes mencionados.

[0018] Existe la necesidad de un extracto de lúpulo preisomerizado que sea estable a la luz, es decir, que no contribuya sustancialmente a la formación de 3-MBT en la cerveza expuesta a la luz, pero que no se haya reducido/hidrogenado químicamente.

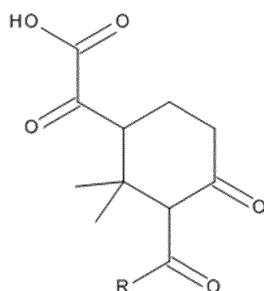
RESUMEN DE LA INVENCION

[0019] Los inventores han descubierto inesperadamente que la estabilidad a la luz de los extractos de lúpulo preisomerizados puede mejorarse sustancialmente iluminando tales extractos de lúpulo con luz solar. Aunque los

inventores no desean verse limitados por la teoría, se cree que, como resultado de esta iluminación, los iso-alfa-ácidos experimentan el mismo tipo de degradación fotolítica que es responsable de la formación de 3-MBT en la cerveza. Sin embargo, en ausencia de reactivos importantes (como las sustancias que contienen tiol), los productos de degradación intermedios reactivos formados durante la iluminación que, de otro modo, participarían en la formación de 3-MBT se convierten en otros productos de reacción que no afectan negativamente al sabor o a la estabilidad del sabor de la cerveza.

[0020] La iluminación del extracto de lúpulo preisomerizado según la presente invención mejora en gran medida la estabilidad a la luz del extracto de lúpulo, pero sorprendentemente no tiene más que un impacto limitado en el amargor y las características de sabor deseables del extracto de lúpulo.

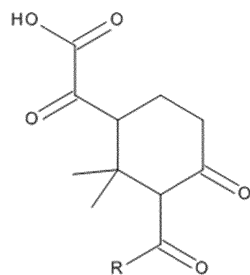
[0021] Los inventores han descubierto además que durante la iluminación del extracto de lúpulo preisomerizado se forman cantidades sustanciales de las siguientes sustancias derivadas del lúpulo (incluidos todos los isómeros):



donde R = $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

[0022] Estas sustancias se encuentran en extractos de lúpulo preisomerizados convencionales en cantidades mínimas. Sin embargo, en los extractos de lúpulo preisomerizados iluminados de la presente invención están presentes en niveles de concentración significativos.

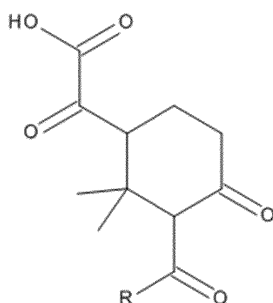
[0023] Un aspecto de la presente invención se refiere a un extracto de lúpulo estable a la luz que comprende al menos 1 g por kg de materia seca de una o más sustancias derivadas del lúpulo representadas por la siguiente fórmula (I):



10

donde R = $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

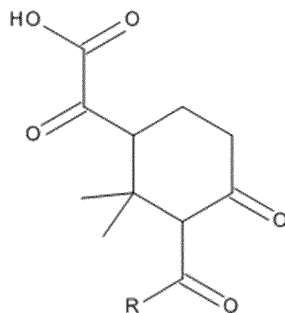
[0024] La presente invención también se refiere a una cerveza que comprende extracto de lúpulo estable a la luz, donde dicha cerveza contiene al menos 40 µg/l de riboflavina y al menos 0,1 mg/l de una o más sustancias derivadas del lúpulo representadas por la siguiente fórmula (I):



donde R = $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 5 [0025] En consecuencia, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un extracto de lúpulo estable a la luz que comprende al menos 1 g por kg de materia seca de una o más sustancias derivadas del lúpulo representadas por la siguiente fórmula (I):



- 10 donde R = $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

- 15 [0026] El término "sustancias derivadas del lúpulo" como se usa en este documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a sustancias de oxociclohexilo sustituidas representadas por la fórmula (I) mencionada anteriormente. Las sustancias derivadas del lúpulo antes mencionadas pueden presentarse en diferentes formas isoméricas. Todas estas formas isoméricas, incluidos los tautómeros y las formas estereoisoméricas, están incluidas en la definición mencionada anteriormente de "sustancias derivadas del lúpulo".

- 20 [0027] El término "iso-alfa-ácidos", como se usa en este documento, se refiere a sustancias seleccionadas del grupo de isohumulona, isoadhumulona, isocohumulona, pre-isohumulona, post-isohumulona y combinaciones de estas. El término "iso-alfa-ácidos" abarca diferentes estereoisómeros (cis-iso-alfa-ácidos y trans-iso-alfa-ácidos).

- 25 [0028] El término "ácidos alfa" como se usa en el presente documento se refiere a sustancias seleccionadas del grupo de humulona, adhumulona, cohumulona, prehumulona, posthumulona y combinaciones de estas.

- [0029] El término "ácidos beta", como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias seleccionadas del grupo de lupulona, adlupulona, colupulona, prelupulona y poslupulona y combinaciones de estas.

- 30 [0030] El término "sustancia derivada de la isohumulona", como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias derivadas del lúpulo como se ha definido anteriormente, en las que R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

- [0031] El término "sustancia derivada de la isocohumulona", como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias derivadas del lúpulo como se ha definido anteriormente, en las que R = $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

- 35 [0032] El término "cerveza", como se usa en el presente documento, abarca tanto la cerveza que contiene alcohol como la cerveza sin alcohol.

- 40 [0033] La concentración de las sustancias derivadas del lúpulo en un extracto de lúpulo o en la cerveza puede determinarse adecuadamente mediante LC-MS, utilizando la metodología que se describe en este documento.

- 45 [0034] El extracto de lúpulo estable a la luz de la presente invención normalmente contiene las sustancias derivadas del lúpulo en una concentración de al menos 3 g por kg de materia seca, más preferiblemente en una concentración de al menos 6 g por kg de materia seca y, de la manera más preferible, de al menos 10 g por kg de materia seca. Típicamente, el extracto de lúpulo no contiene más de 350 g, preferiblemente no más de 250 g de sustancias derivadas del lúpulo por kg de materia seca.

- 50 [0035] Según una forma de realización preferida de la presente invención, el extracto de lúpulo estable a la luz contiene cantidades significativas de una o más sustancias derivadas del lúpulo según la fórmula (I) en la que R = $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Se cree que esta sustancia derivada del lúpulo se origina a partir de la isocohumulona y se denomina en el presente documento sustancia derivada de la isocohumulona. Típicamente, el extracto de lúpulo estable a la luz contiene la sustancia derivada de la isocohumulona en una concentración de al menos 0,3 g por kg de materia seca, más preferiblemente en una concentración de al menos 1 g por kg de materia seca y, de la manera más preferible, de al menos 3 g por kg de materia seca.

- 55 [0036] Como se explica a continuación, los inventores han identificado dos sustancias derivadas de la isocohumulona en el extracto de lúpulo estable a la luz de la presente invención. Estas dos sustancias derivadas

de la isocohumulona, denominadas Co1 y Co2, se describen con más detalle a continuación. Típicamente, el extracto de lúpulo estable a la luz contiene la sustancia Co2 derivada de la isocohumulona en una concentración de al menos 0,2 g por kg de materia seca, más preferiblemente en una concentración de al menos 0,7 g por kg de materia seca y, de la manera más preferible, de al menos 2 g por kg de materia seca.

[0037] Según otra forma de realización preferida de la presente invención, el extracto de lúpulo estable a la luz contiene cantidades significativas de una o más sustancias derivadas del lúpulo según la fórmula (I) en la que $R = -CH_2CH(CH_3)_2$. Se cree que esta sustancia derivada del lúpulo se origina a partir de la isohumulona y se denomina en el presente documento sustancia derivada de la isohumulona. Típicamente, el extracto de lúpulo estable a la luz contiene la sustancia derivada de la isohumulona en una concentración de al menos 0,5 g por kg de materia seca, más preferiblemente en una concentración de al menos 2 g por kg de materia seca y, de la manera más preferible, de al menos 5 g por kg de materia seca.

[0038] El extracto de lúpulo estable a la luz de la presente invención típicamente contiene al menos 1 %, más preferiblemente al menos 2 % y más preferiblemente al menos 3 % de iso-alfa-ácidos en peso de materia seca.

[0039] Según una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el extracto de lúpulo estable a la luz contiene las sustancias derivadas del lúpulo en una concentración de al menos 1 %, más preferiblemente al menos 3 %, aún más preferiblemente al menos 5 %, aún más preferiblemente al menos 10 % y, de la manera más preferible, al menos 20 % en peso de los iso-alfa-ácidos que están contenidos en el extracto.

[0040] Típicamente, el extracto de lúpulo estable a la luz contiene al menos 0,3 %, más preferiblemente al menos 3 % y, de la manera más preferible, al menos 6 % de la sustancia derivada de la isocohumulona en peso de los iso-alfa-ácidos que están contenidos en el extracto.

[0041] El extracto de lúpulo estable a la luz contiene preferiblemente al menos 0,5 %, más preferiblemente al menos 5 % y, de la manera más preferible, al menos 10 % de la sustancia derivada de la isohumulona en peso de los iso-alfa-ácidos que están contenidos en el extracto.

[0042] Los ácidos alfa están típicamente contenidos en el extracto de lúpulo estable a la luz en una concentración de 0-10 %, más preferiblemente de 0-3 % y, de la manera más preferible, de 0,01-2 % en peso de materia seca.

[0043] El extracto de lúpulo estable a la luz de la presente invención contiene normalmente del 0 al 10 % de ácidos beta en peso de materia seca, más preferiblemente del 0 al 5 % de ácidos beta en peso de materia seca.

[0044] La cantidad de iso-alfa-ácidos reducidos (dihidro-iso-alfa-ácidos, tetrahidro-iso-alfa-ácidos y hexahidro-iso-alfa-ácidos) en el extracto de lúpulo estable a la luz preferiblemente no supera el 10 % en peso de los iso-alfa-ácidos. Aún más preferiblemente, la cantidad de iso-alfa-ácidos reducidos no supera el 3 % en peso de los iso-alfa-ácidos.

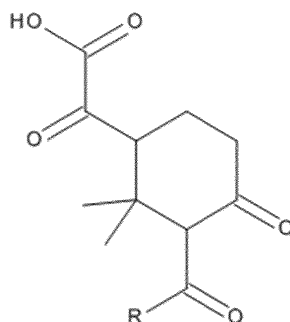
[0045] El extracto de lúpulo estable a la luz de la presente invención normalmente comprende al menos 20 mg/l de las sustancias derivadas del lúpulo. Más preferiblemente, el extracto de lúpulo estable a la luz contiene al menos 80 mg/l de las sustancias derivadas del lúpulo, de la manera más preferible, al menos 150 mg/l de dichas sustancias derivadas del lúpulo.

[0046] El extracto de lúpulo estable a la luz es preferiblemente un extracto de lúpulo que se ha aislado del lúpulo mediante extracción con dióxido de carbono líquido o supercrítico.

[0047] El extracto de lúpulo estable a la luz de la presente invención es preferiblemente un extracto de lúpulo preisomerizado, más preferiblemente un extracto de lúpulo preisomerizado que contiene iso-alfa-ácidos y ácidos alfa en una relación en peso que excede 10:1, de la manera más preferible, en una relación en peso que excede 20:1.

[0048] El extracto de lúpulo estable a la luz tiene preferiblemente un contenido de agua de al menos 30 % en peso, más preferiblemente un contenido de agua de al menos 50 % en peso y, de la manera más preferible, de al menos 70 % en peso.

[0049] Otro aspecto de la presente invención se refiere a una cerveza que comprende extracto de lúpulo estable a la luz, donde dicha cerveza contiene al menos 40 µg/l de riboflavina y al menos 0,1 mg/l de una o más sustancias derivadas del lúpulo representadas por la siguiente fórmula (I):



donde R = $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

5 [0050] Como se ha explicado anteriormente en este documento, la riboflavina tiene un papel importante en la formación de 3-MBT inducida por la luz en la cerveza. La riboflavina está presente de manera natural en la cerveza y sufre una fotólisis extremadamente rápida. De hecho, en la cerveza normal, la riboflavina se fotoliza mucho más rápidamente que los iso-alfa-ácidos. Por lo tanto, en la cerveza expuesta a la luz (golpe de luz), el contenido de riboflavina generalmente se reduce a solo una fracción del contenido original, incluso antes de que se haya fotolizado una fracción significativa de los iso-alfa-ácidos.

[0051] La cerveza estable a la luz de la presente invención difiere de la cerveza normal en que contiene al menos 0,1 mg/l de una o más de las sustancias derivadas del lúpulo mencionadas anteriormente. Esta cerveza estable a la luz se diferencia de la cerveza susceptible al golpe de luz en que contiene simultáneamente al menos 0,1 mg/l de estas sustancias derivadas del lúpulo y al menos 40 µg/l de riboflavina.

[0052] La cerveza de la presente invención contiene típicamente al menos 0,2 mg/l, más preferiblemente al menos 0,4 mg/l, e incluso más preferiblemente al menos 1 mg/l de una o más sustancias derivadas del lúpulo. Típicamente, la concentración de una o más sustancias de lúpulo fotolizadas en la cerveza no supera los 50 mg/l. Más preferiblemente, dicha concentración no supera los 40 mg/l, incluso más preferiblemente, no supera los 30 mg/l y, de la manera más preferible, no supera los 20 mg/l.

[0053] La cerveza estable a la luz contiene preferiblemente al menos 0,03 mg/l, más preferiblemente al menos 0,1 mg/l y, de la manera más preferible, al menos 0,3 mg/l de la sustancia derivada de la isocohumulona.

[0054] La sustancia derivada de la isocohumulona Co2 está preferiblemente contenida en la cerveza estable a la luz en una concentración de al menos 0,02 mg/l, más preferiblemente de al menos 0,07 mg/l y, de la manera más preferible, de al menos 0,2 mg/l.

[0055] La cerveza estable a la luz contiene preferiblemente al menos 0,05 mg/l, más preferiblemente al menos 0,2 mg/l y, de la manera más preferible, al menos 0,5 mg/l de la sustancia derivada de la isohumulona.

[0056] El contenido de riboflavina de la cerveza estable a la luz es preferiblemente de al menos 60 µg/l, de la manera más preferible, el contenido de riboflavina está en el rango de 80 a 2000 µg/l.

[0057] Según una forma de realización particularmente preferida, la sustancia o sustancias derivadas del lúpulo y la riboflavina están presentes en la cerveza estable a la luz en una relación en peso que no excede 200:1, más preferiblemente en una relación en peso que está en el rango de 1:1. 1 a 100:1 y, de la manera más preferible, en el rango de 2:1 a 50:1.

[0058] La cerveza estable a la luz normalmente contiene la sustancia derivada de la isocohumulona y riboflavina en una relación en peso que no excede 100:1, más preferiblemente en una relación en peso de 1:2 a 50:1, más preferiblemente de 1:1 a 40:1.

[0059] La cerveza estable a la luz normalmente contiene la sustancia derivada de la isohumulona y riboflavina en una relación en peso que no excede 160:1, más preferiblemente en una relación en peso de 1:1 a 80:1, más preferiblemente de 2:1 a 60:1.

[0060] La cerveza estable a la luz de la presente invención normalmente contiene al menos 0,1 mg/l, más preferiblemente al menos 0,3 mg/l, aún más preferiblemente al menos 0,6 mg/l y, de la manera más preferible, al menos 1 mg/l de iso-alfa-ácidos. Normalmente, la concentración de iso-alfa-ácidos en la cerveza no superará los 30 mg/l.

[0061] La sustancia o sustancias derivadas del lúpulo están preferiblemente contenidas en la cerveza estable a la luz en una concentración de al menos el 1 %, más preferiblemente de al menos el 3 %, aún más preferiblemente

de al menos el 5 % y, de la manera más preferible, de al menos el 10 % en peso de los iso-alfa-ácidos que también contiene la cerveza.

[0062] La cerveza estable a la luz de la presente invención contiene típicamente menos de 100 ng/l de 3-metil-2-buten-1-ol (3-MBT). Incluso más preferiblemente, el contenido de 3-MBT es inferior a 50 ng/l, de la manera más preferible, inferior a 30 ng/l. La concentración de 3-MBT puede determinarse adecuadamente por medio del método descrito por Hughes et al (Hughes P. S., Burke S. & Meacham A. E. (1997) "Aspects of the lightstruck character of beer". Institute of Brewing, Proceedings of the 6th Central and South Africa Section, pp. 123-128).

[0063] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un proceso de preparación de una cerveza como se ha definido anteriormente en el presente documento, donde dicho proceso comprende la introducción de un extracto de lúpulo estable a la luz como se ha definido anteriormente en el presente documento.

[0064] El extracto de lúpulo estable a la luz se añade preferiblemente al mosto o a la cerveza antes de la clarificación, es decir, antes de eliminar los sólidos en suspensión y la levadura de la cerveza fermentada. Normalmente, la clarificación de la cerveza fermentada se logra mediante filtración.

[0065] En el proceso antes mencionado, el extracto de lúpulo estable a la luz se introduce preferiblemente en el mosto o la cerveza en una concentración de al menos 2 mg/l, más preferiblemente en una concentración de 5-200 mg/l, más preferiblemente en una concentración de 10-150mg/l.

[0066] Después de añadir el extracto de lúpulo estable a la luz al mosto, el mosto se somete a más pasos de procesamiento, que incluyen:

- fermentación del mosto con la ayuda de levadura de cerveza;
- clarificación de la cerveza fermentada; y
- envasado.

[0067] Según una forma de realización particularmente preferida, el extracto de lúpulo preisomerizado se ilumina con luz que tiene una intensidad máxima a una longitud de onda en el rango de 200-800 nm, más preferiblemente en el rango de 250-600 nm, de la manera más preferible, de 300-500 nm.

[0068] La intensidad de iluminación empleada en el presente proceso preferiblemente supera los 50 W/m². Más preferiblemente, dicha intensidad de iluminación supera los 100 W/m², de la manera más preferible, supera los 200 W/m².

[0069] El extracto de lúpulo preisomerizado normalmente se ilumina con la intensidad de iluminación mencionada anteriormente durante al menos 30 minutos, más preferiblemente durante al menos 1 hora y, de la manera más preferible, durante 2-48 horas.

[0070] Durante la iluminación, la temperatura del extracto de lúpulo normalmente permanece dentro del rango de 0-100 °C, más preferiblemente de 15-80 °C.

[0071] Los inventores han descubierto que se pueden obtener resultados particularmente buenos si el extracto de lúpulo preisomerizado se expone a la iluminación después de haberse diluido con agua. En consecuencia, según una forma de realización particularmente preferida, el presente método comprende los pasos de:

- diluir el extracto preisomerizado con agua para producir una solución acuosa; e
- iluminar una solución acuosa del extracto de lúpulo preisomerizado.

[0072] La solución acuosa diluida del extracto de lúpulo preisomerizado normalmente tiene un contenido de iso-alfa-ácidos en el rango de 0,2 a 200 g/l, más preferiblemente de 0,5 a 70 g/l y, de la manera más preferible, de 1 a 25 g/l cuando comienza la iluminación.

[0073] La solución acuosa diluida del extracto de lúpulo preisomerizado normalmente contiene al menos un 80 % en peso de agua. Aún más preferiblemente, dicha dilución contiene al menos un 90 % en peso de agua, de la manera más preferible, al menos un 95 % en peso de agua.

[0074] La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Método para determinar la concentración de sustancias derivadas del lúpulo

[0075] Las concentraciones de 4 sustancias derivadas del lúpulo diferentes representadas por la fórmula (I) pueden determinarse mediante UPLC-MS utilizando el procedimiento que se describe a continuación. Estas 4

sustancias derivadas del lúpulo incluyen dos sustancias derivadas de la isocohumulona (denominadas Co1 y Co2) y dos sustancias derivadas de la isohumulona (denominadas N1 y N2). Los tiempos de retención típicos de estas sustancias en el método UPLC-MS que se describe a continuación se enumeran a continuación.

Sustancia	Tiempo de retención (min.)
Co1	6,87
Co2	7,99
N1	9,08
N2	9,99

5

[0076] Los espectros de masas de estas sustancias derivadas del lúpulo se muestran en las Figuras 1-4.

[0077] La concentración de cada sustancia derivada del lúpulo se determina sobre la base de curvas de calibración para cada una de las sustancias derivadas del lúpulo. Estas sustancias derivadas del lúpulo se pueden aislar en forma muy pura a partir de extracto de lúpulo preisomerizado iluminado mediante UPLC preparativa.

10

[0078] Las curvas de calibración para las sustancias derivadas del lúpulo se determinan utilizando las condiciones del detector que se describen a continuación.

15

[0079] El equipo, los materiales y las condiciones que se describen a continuación pueden utilizarse para determinar las concentraciones de las sustancias derivadas del lúpulo antes mencionadas.

Equipo:

20

[0080]

Sistema UPLC: Acquity UPLC (Waters) equipado con una columna BEH C18 (1,7 µm, 2,1 mm × 150 mm; número de producto de Waters: 186002353)

Detector: Espectrómetro de masas XEVO TQ-S (Waters)

Productos químicos:

25

[0081]

Agua ultrapura "Milli-Q® Ultrapure Water"

Acetonitrilo ≥ 99,9 % (JT-Baker: 9853-02)

30

Ácido fórmico ≥ 98 % (Número de producto de Sigma-Aldrich: 33015)

Condiciones del instrumental de UPLC:

[0082]

35

Temperatura de la columna: 60 °C

Volumen de inyección: 1 µL

Temperatura de la muestra: 10 °C

Tiempo de ejecución: 25 minutos

40

Eluyente A = 1000 mL de agua ultrapura + 1 mL de ácido fórmico

Eluyente B = 1000 mL de acetonitrilo + 1 mL de ácido fórmico

Gradiente:

45

[0083]

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0,0	0,25	95	5
10	0,25	59	41
11	0,25	95	5
25	0,25	95	5

Condiciones del detector:

50

[0084] El método analítico se configura en modo de barrido negativo (ES-) y modos de monitoreo de reacciones múltiples (MRM).

Configuración de MS:

[0085]

Polaridad	ES-
Capilar (kV)	2,5
Temperatura de la fuente (°C)	150
Temperatura de desolvatación (°C)	600
Flujo de gas del cono (L/Hr)	150
Flujo de gas de desolvatación (L/Hr)	1000
Flujo de gas de colisión (mL/min)	0,22

5

Modos de monitoreo de reacciones múltiples (MRM):

[0086]

	Padre (m/z)	Hijo (m/z)	Col (eV)
Co1 y Co2	267	195	20
N1 y N2	281	209	20

10

[0087] Las muestras se desgasifican antes del análisis.

Método de determinación de la concentración de riboflavina

15 [0088] La concentración de riboflavina en la cerveza se puede determinar por medio de UPLC-FLR utilizando equipos, materiales y condiciones como se describe a continuación.

Equipo:

20 [0089]

Sistema UPLC: Acquity UPLC (Waters) equipado con una columna BEH C18 (1,7 µm, 2,1 mm × 150 mm; número de producto de Waters: 186002353)

Detector: Detector de fluorescencia Acquity (FLR) (Waters)

Productos químicos:

25 [0090]

Agua ultrapura Milli-Q®

Acetonitrilo ≥ 99,9 % (número de producto de Sigma Aldrich: 34998)

Ácido fosfórico ≥85,0 % (número de producto de Sigma Aldrich: 30417)

30 Riboflavina (número de producto de Sigma Aldrich: R-7649)

Dihidrógenofosfato de sodio monohidrato (número de producto Merck: 106346)

Tampón de pH 2,7 (7,5 g de dihidrogenofosfato de sodio monohidrato en 200 mL de agua ultrapura + 1 mL de ácido fosfórico en 1000 mL de agua ultrapura)

35 Condiciones del instrumental de UPLC:

[0091]

Temperatura de la columna: 40 °C

40 Volumen de inyección: 10 µL

Temperatura de la muestra: 10 °C

Tiempo de ejecución: 15 minutos

Eluyente A = tampón de pH 2,7

Eluyente B = acetonitrilo

Gradiente:

[0092]

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0,00	0,20	95	5
10,0	0,20	95	5
10,5	0,20	15	85
12,0	0,20	15	85
12,2	0,20	95	5
15,0	0,20	95	5

5 Condiciones del detector:

[0093]

$\lambda_{\text{ex}} = 444\text{nm}$

10 $\lambda_{\text{em}} = 525\text{ nm}$

[0094] Las muestras se desgasifican antes del análisis.

Ejemplo 1

15

[0095] Se utilizó como material de partida un extracto de lúpulo preisomerizado (denominado "Isohop" obtenido de Barth-Haas Group). Este extracto de lúpulo tenía las siguientes características (según la hoja de descripción del producto de Barth-Haas Group):

- 20
- contiene $30 \pm 0,5$ % en peso de iso-alfa-ácidos
 - contiene $<0,7$ % de ácidos alfa
 - contiene $<0,3$ % de ácidos beta

25 [0096] El extracto de lúpulo preisomerizado se diluyó con agua ultrapura "Milli-Q® Ultrapure wáter" (1:50 p/p). Se introdujeron 16 ml del extracto de lúpulo diluido en un tubo de vidrio con tapón de rosca (vidrio Duran, el diámetro del tubo es de 16 mm, la longitud del tubo es de 160 mm). 30 de estos tubos de vidrio se iluminaron simultáneamente durante un período de 32 horas dentro de un dispositivo Suntest XLS+ (ATLAS), utilizando una lámpara de xenón. Durante la iluminación, se aplicaron las siguientes condiciones:

- 30
- La potencia de la lámpara de xenón era de 1700 W.
 - Los tubos se colocaron horizontalmente dentro del dispositivo Suntest XLS+
 - La distancia entre los tubos de vidrio y la lámpara era de 25 cm.
 - La cantidad de irradiación al nivel de la muestra se fijó en 765 W/m^2
 - La temperatura del extracto de lúpulo diluido aumentó desde la temperatura ambiente hasta alrededor
- 35 de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (no se aplicó intencionalmente enfriamiento ni calentamiento durante la iluminación)

40 [0097] Antes y después de la iluminación, se determinaron las concentraciones de iso-alfa-ácidos y sustancias derivadas del lúpulo en el extracto de lúpulo. La determinación de los iso-alfa-ácidos en el extracto de lúpulo se realizó según el método descrito por la European Brewery Convention (EBC) en 2005: "Method 7.8: Iso-alpha-, alpha- and beta-acids in hops, hop powder products and hop extracts (HPLC method)". La determinación de la concentración de las sustancias derivadas del lúpulo en el extracto se realizó según el método descrito anteriormente. Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2

	Iso-alfa-ácidos (mg/L)	Sustancias derivadas del lúpulo				
		Co1 (mg/L)	Co2 (mg/L)	N1 (mg/L)	N2 (mg/L)	Suma (mg/L)
Extracto de lúpulo	5808	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$
Extracto de lúpulo estable a la luz	339	65	264	174	372	875

45

Ejemplo 2

50 [0098] Los extractos de lúpulo iluminados y no iluminados del Ejemplo 1 se añadieron a cerveza sin lúpulo (300 ml de cerveza sin lúpulo en botella verde). Se preparó una primera cerveza (cerveza de referencia) añadiendo 20 mg/L del extracto de lúpulo no iluminado. Se preparó una segunda cerveza (cerveza estable a la luz) añadiendo 60 mg/L del extracto de lúpulo iluminado. El extracto de lúpulo iluminado se aplicó en una concentración más alta para compensar la pérdida de intensidad amarga que se había producido como resultado

de la iluminación. El perfil de sabor de la cerveza que contenía el extracto de lúpulo iluminado tenía un perfil de sabor que era muy similar al de la cerveza que contenía el extracto de lúpulo no iluminado.

[0099] Ambas cervezas se expusieron a la luz solar artificial colocando las botellas en forma horizontal en el dispositivo Suntest XLS+ e iluminándolas por un periodo de 24 horas. Durante la iluminación, se aplicaron las mismas condiciones que en el Ejemplo 1.

[0100] Antes y durante la exposición a la luz solar artificial se determinaron las concentraciones de las siguientes sustancias en ambas cervezas:

- las sustancias derivadas del lúpulo con la fórmula (I),
- iso-alfa-ácidos,
- riboflavina, y
- 3-MBT.

[0101] La determinación de los iso-alfa-ácidos en la cerveza se realizó según el método descrito por la American Society of Brewing Chemists (ASBC) en 2009 (Methods of Analysis, 14.^a edición): "Method Beer 23 (section E: Iso-alpha acids in beer by HPLC)". El contenido de 3-MBT se determinó utilizando el método descrito por Hughes et al. ("Aspects of the lightstruck character of beer". Institute of Brewing, Proceedings of the 6th Central and South Africa Section (1997), pp. 123-128). La determinación de la concentración de sustancias derivadas del lúpulo y riboflavina en la cerveza se realizó según los métodos descritos anteriormente.

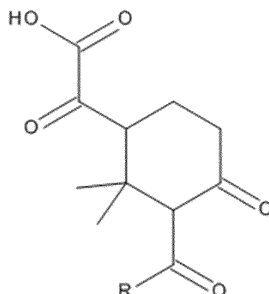
[0102] Los resultados de estos análisis se resumen en la Tabla 3:

Tabla 3

	Iso-alfa-ácidos (mg/L)	Sustancias derivadas del lúpulo					Riboflavina (µg/L)	MBT (ng/L)
		Co1 (mg/L)	Co2 (mg/L)	N1 (mg/L)	N2 (mg/L)	Suma (mg/L)		
Cerveza de referencia								
0h de iluminación	19,2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	318	7
2h de iluminación	18,8	0,01	0,02	0,03	0,04	0,11	16	309
6h de iluminación	17,8	0,05	0,08	0,11	0,15	0,39	2,8	660
24h de iluminación	16,0	0,19	0,28	0,42	0,54	1,42	0,3	2072
Cerveza estable a la luz								
0h de iluminación	4,5	0,53	2,32	1,65	3,54	8,04	313	8
2h de iluminación	4,4	0,56	2,29	1,66	3,45	7,95	15	74
6h de iluminación	4,2	0,61	2,20	1,77	3,29	7,87	2,0	137
24h de iluminación	3,6	0,86	2,19	2,18	3,18	8,41	0,4	506

REIVINDICACIONES

1. Cerveza que comprende extracto de lúpulo estable a la luz, donde dicha cerveza contiene al menos 40 µg/l de riboflavina y al menos 0,1 mg/l de una o más sustancias derivadas del lúpulo representadas por la fórmula (I):



donde R = -CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)CH₂CH₃ o -CH₂CH(CH₃)₂.

2. Cerveza según la reivindicación 1, donde la cerveza contiene al menos 0,2 mg/l, preferiblemente al menos 0,4 mg/l, más preferiblemente al menos 1 mg/l de una o más sustancias derivadas del lúpulo.

3. Cerveza según la reivindicación 1 o 2, donde la cerveza no contiene más de 50 mg/l, preferiblemente no más de 40 mg/l, más preferiblemente no más de 30 mg/l de una o más sustancias derivadas del lúpulo.

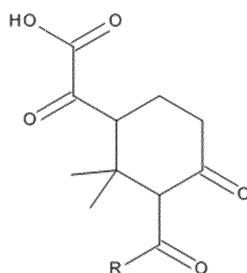
4. Cerveza según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cerveza contiene al menos 60 µg/l, preferiblemente 80-2000 µg/l de riboflavina.

5. Cerveza según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sustancia o sustancias derivadas del lúpulo y la riboflavina están presentes en una relación en peso que no excede de 200:1, preferiblemente en una relación en peso que está en el rango de 1:1 a 100:1.

6. Cerveza según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cerveza contiene al menos 0,1 mg/l, preferiblemente al menos 0,3 mg/l, más preferiblemente al menos 0,6 mg/l de iso-alfa-ácidos.

7. Cerveza según la reivindicación 6, donde la cerveza contiene al menos un 1 %, más preferiblemente al menos un 3 % y, de la manera más preferible, al menos un 5 % en peso de los iso-alfa-ácidos de las sustancias derivadas del lúpulo.

8. Extracto de lúpulo estable a la luz que comprende al menos 1 g por kg de materia seca de una o más sustancias derivadas del lúpulo representadas por la siguiente fórmula (I):



donde R = -CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)CH₂CH₃ o -CH₂CH(CH₃)₂.

9. Extracto de lúpulo según la reivindicación 8, donde el extracto de lúpulo contiene una o más sustancias derivadas del lúpulo en una concentración de al menos 3 g por kg de materia seca, preferiblemente en una concentración de al menos 6 g por kg de materia seca y más preferiblemente de al menos 10 g por kg de materia seca.

10. Extracto de lúpulo según la reivindicación 8 o 9, donde el extracto de lúpulo contiene al menos un 1 %, más preferiblemente al menos un 3 % y, de la manera más preferible, al menos un 5 % en peso de los iso-alfa-ácidos de una o más sustancias derivadas del lúpulo.

11. Extracto de lúpulo según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde el extracto de lúpulo contiene al menos un 1 % de iso-alfa-ácidos en peso de materia seca.

12. Extracto de lúpulo según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde el extracto de lúpulo contiene alfa-ácidos en una concentración del 0-10 % en peso de materia seca, preferiblemente del 0-3 % en peso de materia seca y más preferiblemente del 0,01-2 % en peso de materia seca.
- 5 13. Extracto de lúpulo según cualquiera de las reivindicaciones 8-12, donde el extracto de lúpulo contiene ácidos beta en una concentración del 0-10 % en peso de materia seca, preferiblemente del 0-5 % en peso de materia seca.
- 10 14. Extracto de lúpulo según cualquiera de las reivindicaciones 8-13, donde el extracto de lúpulo contiene iso-alfa-ácidos reducidos en una concentración que no supera el 10 % en peso de los iso-alfa-ácidos, preferiblemente no supera el 3 % en peso de los iso-alfa-ácidos; donde dichos iso-alfa-ácidos reducidos se seleccionan de entre dihidro-iso-alfa-ácidos, tetrahidro-iso-alfa-ácidos, hexahidro-iso-alfa-ácidos y combinaciones de los mismos.
- 15 15. Proceso de preparación de una cerveza, donde dicho proceso comprende introducir un extracto de lúpulo según cualquiera de las reivindicaciones 8-14.

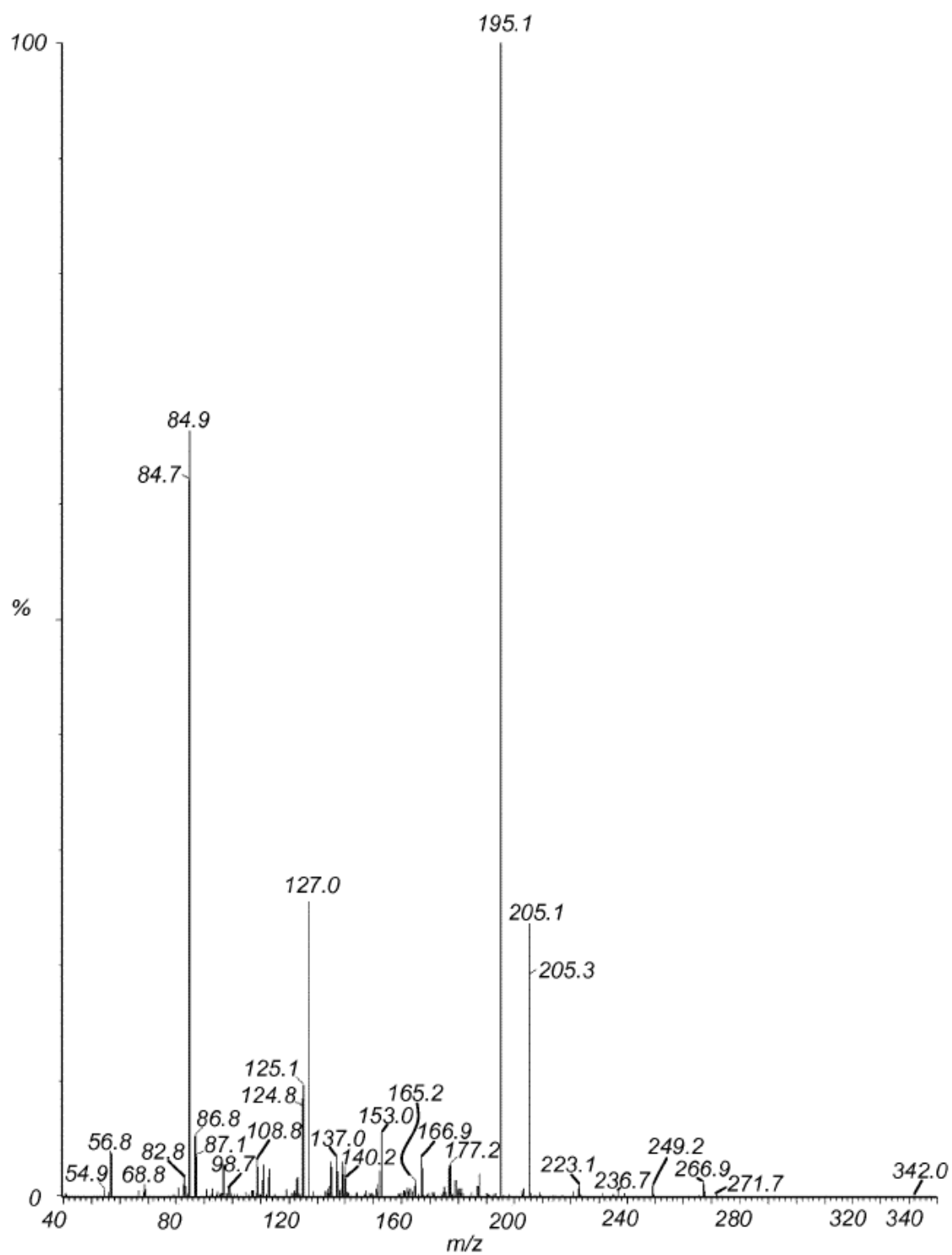
Fig. 1

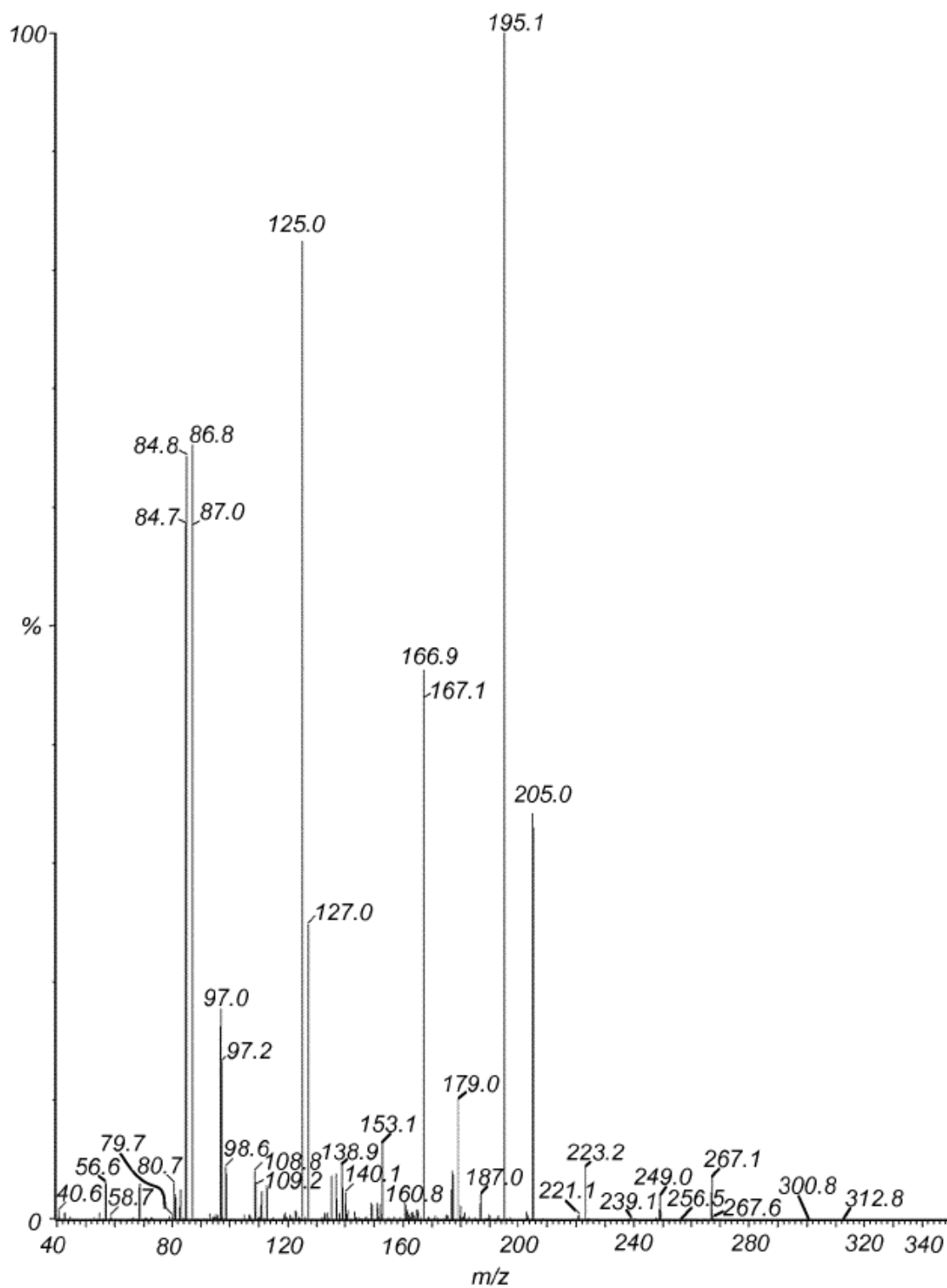
Fig. 2

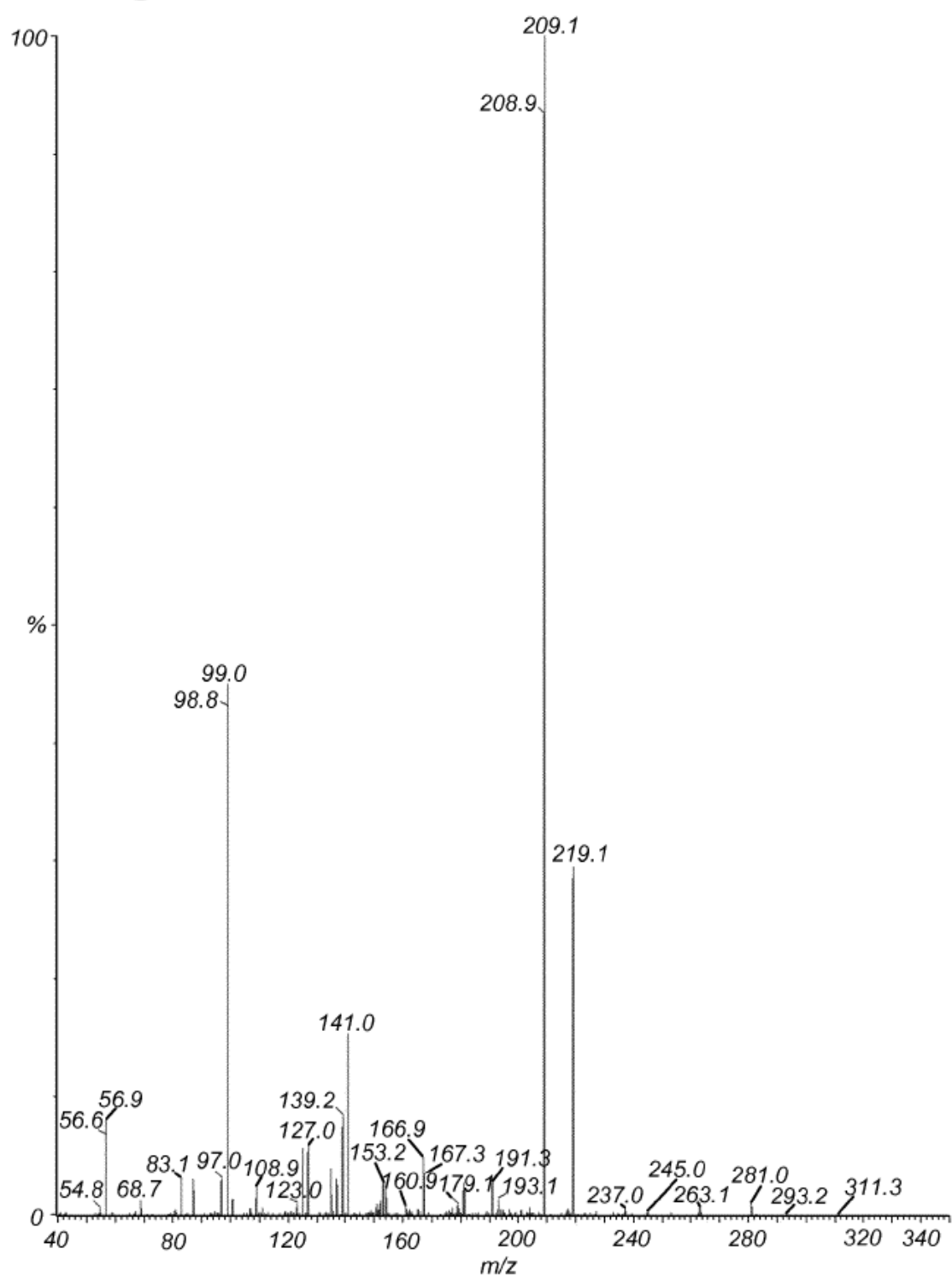
Fig. 3

Fig. 4